



## Poszukiwanie zmutowanego genu<sup>1</sup>

*In search of a mutated gene*

JANUSZ G. ZIMOWSKI

Z Zakładu Genetyki IPiN w Warszawie

**STRESZCZENIE.** Genetyka molekularna stworzyła szereg technik badawczych umożliwiających poszukiwanie nowych genów, a następnie poznawanie ich budowy. Część z owych metod znalazła zastosowanie w genetyce medycznej służąc wykrywaniu podłoża molekularnego wielu chorób uwarunkowanych genetycznie. Zadaniem coraz liczniejszych laboratoriów analizy DNA wspierających poradnictwo genetyczne jest opracowywanie efektywnych metod, dzięki którym możliwe jest szybkie i tanie potwierdzanie rozpoznania klinicznego, ustalanie nosicielstwa mutacji chorobotwórczych i wykonywanie diagnostyki prenatalnej. Dobór technik badawczych następuje w oparciu o rodzaj mutacji i sposób jej dziedziczenia. Przedstawiono przykładowe zastosowanie technik hybrydyzacji, PCR, SSCP i sekwencjonowania w genetyce medycznej.

**SUMMARY.** A number of laboratory techniques have been developed in molecular genetics, allowing to look for new genes and then to examine their structure. Some of these methods are used in medical genetics to discover molecular properties underlying many genetically determined diseases. It is the task of more and more numerous DNA analysis laboratories supporting genetic counseling to devise effective methods that would provide a cheap and fast confirmation of clinical diagnoses, identify carriers of pathogenic mutations, and perform prenatal diagnostics. Examination techniques are selected on the grounds of both the mutation type and the way of its inheritance. Examples of application of hybridization techniques, PCR, SSCP and sequencing in medical genetics are presented in the paper.

---

**Słowa kluczowe:** genetyka molekularna / analiza DNA / metodyka

**Key words:** molecular genetics / DNA analysis / laboratory methods

---

Ostatnie ćwierćwiecze to okres gwałtownie rozwijającej się genetyki molekularnej, któremu towarzyszy znaczny postęp technologiczny. Dla określenia powstałych możliwości badawczych stworzono termin „inżynieria genetyczna”, którym objęto wszelkie metody modyfikacji organizmów na poziomie DNA. Niedawno powstały dział biotechnologii, wykorzystujący owe techniki, jest jedną z najszybciej rozwijających się gałęzi gospodarki. Analiza DNA znalazła również zastosowanie w wielu działach medycyny. Stosuje się ją obecnie w genetyce medycznej,

diagnostyce chorób infekcyjnych i pasożytniczych, transplantologii, onkologii i medycynie sądowej. Ostatnie 20 lat to okres znacznego postępu w poznaniu molekularnych podstaw wielu chorób uwarunkowanych genetycznie. Niektóre, znane od lat, o ustalonych zasadach dziedziczenia, doczekały się wreszcie wyjaśnienia mechanizmu ich powstawania.

### **MOLEKULARNE PODŁOŻE CHORÓB DZIEDZICZNYCH**

Przyczyną chorób uwarunkowanych genetycznie są zaburzenia informacji zawartej w DNA, przekazywane z pokolenia na

---

<sup>1</sup> Wykład na V Konferencji Szkoleniowej Ordynatorów, 25 listopada 1998 r., w CMKP, w Warszawie.

pokolenie w postaci zmutowanego genu. Wyróżnia się mutacje dominujące, których obecność w jednej kopii genu wystarcza do wywołania choroby i mutacje recesywne, które ujawniają się dopiero wówczas, gdy w organizmie zabraknie prawidłowej kopii genu (dwa zmutowane allele). Szczególną grupę stanowią mutacje recesywne uszkadzające geny chromosomu X. Choroby wywołane nimi dotyczą jedynie mężczyzn, kobiety zaś zachowując jedną prawidłową kopię genu są ich nosicielkami. Wprowadzone w genetyce klasyczne pojęcie mutacji, oznaczające zmianę sekwencji DNA, prowadzącą do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania genu, zakładało jej trwałość i niezmienność podczas przekazywania potomstwu, oczywiście z wyłączeniem samego momentu jej powstania czy to na skutek błędów popełnianych przez polimerazę DNA, czy pod wpływem czynnika mutagennego. Ze względu na wielkość zmian w DNA wyróżniono:

- 
- mutacje punktowe polegające na zamianie jednego nukleotydu na inny pociągające za sobą zamianę aminokwasu w peptydzie (mutacje zmiany sensu) lub powstanie kodonu stop (mutacje nonsensu) oraz
  - większe rearanżacje DNA, tj. delecje (ubytek) i duplikacje (powtórzenia fragmentu sekwencji) wywołujące podobne lub większe zmiany sensu informacji genetycznej (rys. 1).
- 

Dotychczas każda zmiana sekwencji nukleotydowej była traktowana jako zdarzenie niezależne, nie mające wpływu na inne podobne. Tak rozumiane pojęcie mutacji wynikało z przyjętego założenia, że przygotowująca się do podziału komórka prowadzi proces podwojenia materiału genetycznego (replikacja DNA) oparty na precyzyjnej syntezie nowej nici na matrycy nici istniejącej z zachowaniem komplementarności sekwencji (wzajemne dopasowanie).

Ostatnie lata przyniosły odkrycie nowego rodzaju mutacji – mutacji dynamicznej

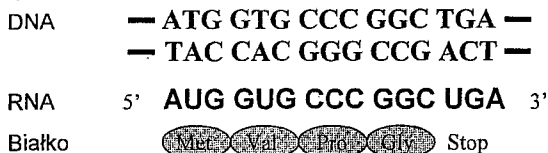
(rysunek 1). Stwierdzono, że istnieją odcinki DNA złożone z wielokrotnych powtórzeń trójek nukleotydowych, których długość ulega pewnym wahaniom (zmienna liczba powtórzeń nukleotydów). Przekroczenie granicznej liczby powtórzeń pociąga za sobą niestabilność zmiennego odcinka i wydłużenie go do wielkości wywołującej chorobotwórczą zmianę budowy i właściwości białka [8]. Nie znamy mechanizmu odpowiedzialnego za taki przebieg dziedziczenia sekwencji złożonych z trójnukleotydowych powtórzeń, wiemy jedynie, że ich niestabilność (zwiększenie lub zmniejszenie liczby powtórzeń) rośnie ze wzrostem ich długości.

### POLIMORFIZM DNA

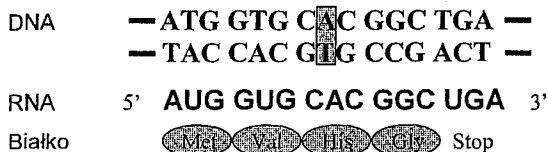
W obrębie jednego gatunku znajdujemy naturalnie występującą zmienność, zarówno fenotypową, jak i genotypową. Przejawia się ona na poziomie DNA pewną różnorodnością sekwencji nukleotydowych, zarówno odcinków kodujących (eksonowych), jak i nie kodujących (intronowych). Możliwość zapisania sekwencji aminokwasowej różnymi trójkami nukleotydowymi (kilka kodonów oznacza ten sam aminokwas), dopuszcza istnienie odmiennych kopii tego samego genu zawierających informację o tym samym białku. Zmienność sekwencji w obrębie intronów jest znacznie większa, a jej ograniczenie dotyczy jedynie części odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg procesu skłaniania RNA (ang. *splicing*), tj. wycinania i usuwania intronów z pierwotnego RNA.

We fragmentach niekodujących – intronach i odcinkach międzygenowych znajdują się liczne sekwencje mikrosatelitarne. Są to odcinki DNA złożone z powtórzeń kilkunukleotydowych (2–6 par zasad), których długość w poszczególnych kopiach genu (allelach) może być różna. Niektóre z nich, jak wspomniano wyżej, w pewnych warunkach stają się sekwencjami niestabilnymi zmieniając swą długość podczas przekazywania ich organizmowi potomnemu (mutacje dynamiczne), pozostałe dziedziczone są bez

Sekwencja prawidłowa



Sekwencja z mutacją zmiany sensu powodująca zastąpienie proliny histydyną

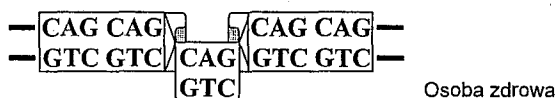


Sekwencja z delecją dwóch nukleotydów powodująca przesunięcie ramki odczytu

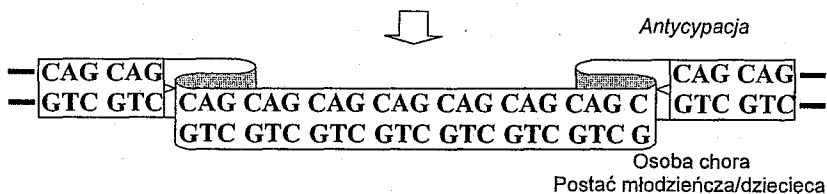
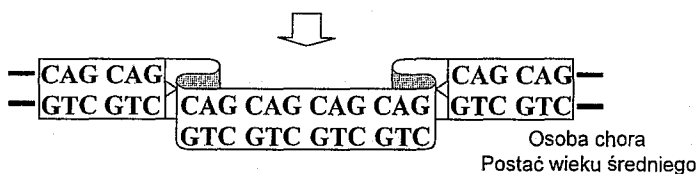


Sekwencja niestabilna – mutacja dynamiczna

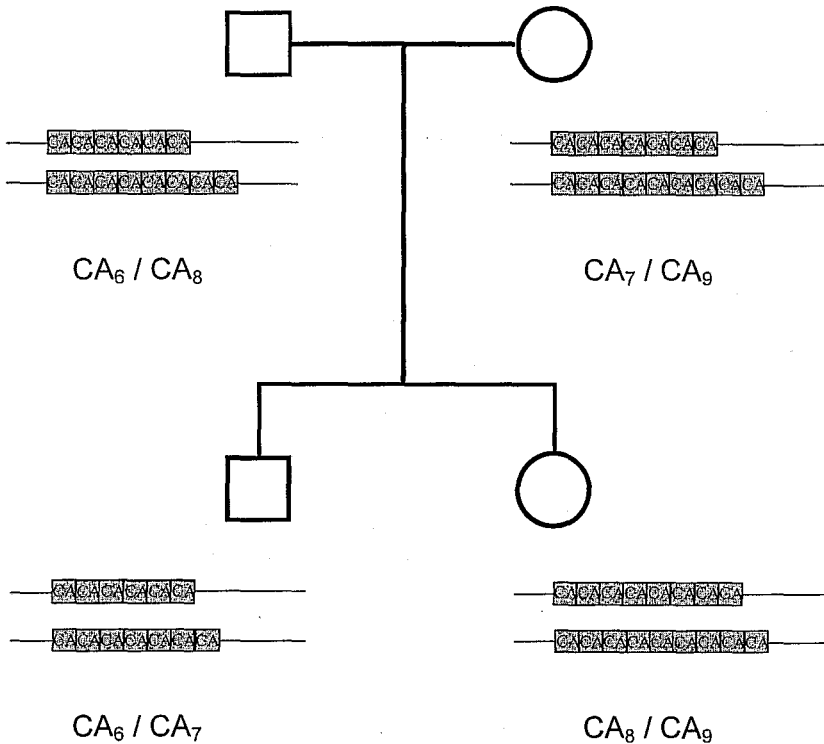
Sekwencja prawidłowa



Przekroczenie granicy stabilności



Rysunek 1. Rodzaje mutacji



Rysunek 2. Schemat dziedziczenia sekwencji mikrosatelitarnej zbudowanej z powtórzeń nukleotydów CA

zmian z pokolenia na pokolenie. Przykład dziedziczenia sekwencji będącej wielokrotnością dwunukleotydu CA obrazuje rys. 2.

Częstość z jaką spotyka się poszczególne warianty sekwencji DNA jest bardzo różna, od pojedynczych przypadków charakterystycznych dla jednej rodziny do występujących w wielu odmianach sekwencji mikrosatelitarnych, spotykanych u szeregu nie spokrewnionych osób. Tę wielopostaciowość przyjęto określać mianem polimorfizmu DNA, jednak zarezerwowano ten termin dla sekwencji nukleotydowych odpowiadających sobie odcinków występujących w populacji u co najmniej 5% osobników. Dla celów użytkowych opisanych poniżej interesujące są jedynie te odcinki DNA, w których częstość napotkania heterozygot (dwie różne sekwencje) jest wysoka – przekracza 30%.

## TECHNIKI WYSZUKIWANIA ZMIAN I POLIMORFIZMU W DNA

### Hybrydyzacja

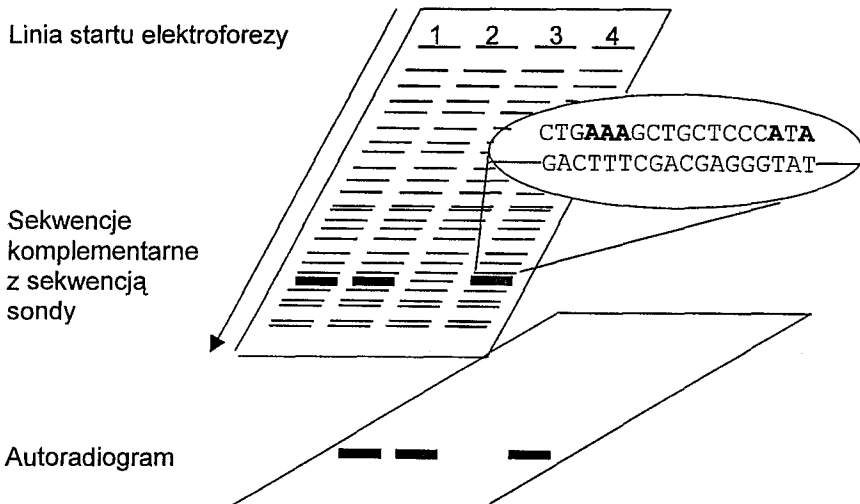
DNA wykazuje właściwość odwracalnego rozdziału dwu budujących go nici. Czynniki umożliwiającymi zerwanie licznych, acz słabych wiązań wodorowych (proces denaturacji) są: środowisko alkaliczne ( $\text{pH} > 7$ ) lub podwyższona temperatura (powyżej  $90^\circ\text{C}$ ). Usunięcie czynnika denaturującego pozwala w procesie renaturacji odbudować strukturę heliksu z zachowaniem komplementarności (dopasowanie sekwencyjne) łączących się nici. Powyższe właściwości stały się podstawą techniki hybrydyzacji wg Southerna. W analizie tej wykorzystuje się odcinki DNA o znanej sekwencji będące fragmentami ludzkiego genomu, nazwane sondami molekularnymi (ang. *probe*), których zadaniem jest odnale-

zienie i przyłączenie się do poszukiwanej (sprawdzonej) sekwencji. Badanie składa się z następujących etapów:

1. pocięcie enzymem restrykcyjnym analizowanego DNA na fragmenty różnej wielkości (wielkość uzyskanych fragmentów zależy od użytego enzymu i sekwencji trawionego DNA),
2. elektroforetyczny rozdział otrzymanych odcinków DNA w żelu agarozowym,
3. alkaliczna denaturacja DNA,
4. przeniesienie na filtr trwale wiążący DNA,
5. hybrydyzacja z wyznakowaną (np. radioaktywnie) i zdenaturowaną sondą molekularną komplementarną do analizowanej sekwencji,
6. autoradiograficzna detekcja wyniku hybrydyzacji.
7. odnalezienie zaczerwienia na kliszy oznacza wykrycie w badanym DNA sekwencji identycznej z sekwencją użytej sondy molekularnej (rys. 3).

## TECHNIKA PCR

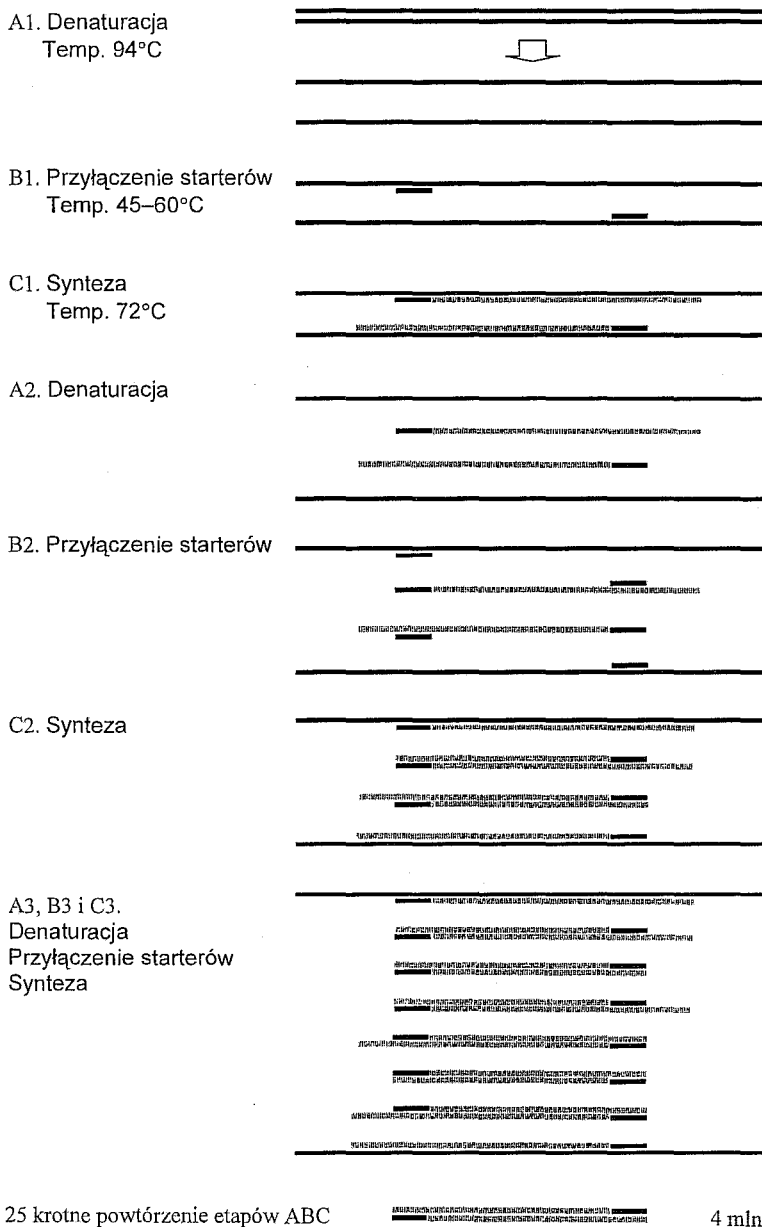
Szeroko dziś stosowana technika reakcji łańcuchowej polimerazy – PCR (ang. *polymerase chain reaction*) polega na syntezie wybranego odcinka DNA ograniczonego starterami. Wykorzystuje się właściwość enzymu, który syntetyzuje drugą nić DNA rozpoczynając tylko od odcinka dwuniciowego (konieczny starter) i wydłuża go w jednym kierunku (rys. 4). Do przeprowadzenia reakcji PCR konieczne są: badane DNA, zaprojektowane i zsyntetyzowane startery, polimeraza DNA wytrzymała na częste zmiany temperatury, w tym temperaturę  $>90^{\circ}\text{C}$ , wolne deoksytrójfosforany nukleotydów i urządzenie, w którym prowadzi się reakcję. Amplifikację DNA uzyskuje się wielokrotnie powtarzając (25–30 razy) trzy kolejne etapy reakcji – rozdzielanie nici DNA (temp.  $>90^{\circ}\text{C}$ ), przyłączenie starterów (temp.  $45\text{--}60^{\circ}\text{C}$ ) i właściwą syntezę nowych nici DNA (temp.  $72^{\circ}\text{C}$ ). Czas trwania i temperatura poszczególnych etapów zależą od składu nukleotydowego



Strzałka oznacza kierunek migracji rozdzielanych fragmentów, pociętego enzymem restrykcyjnym, badanego DNA.

Wythuszczonym drukiem zaznaczono nukleotydy zawierające radioaktywny atom fosforu.

Rysunek 3. Schemat hybrydyzacji radioaktywnej sondy molekularnej z poszukiwaną genomową sekwencją. Brak prążka w analizie nr 3 spowodowany jest delecją fragmentu genu rozpoznawanego przez użytą sondę

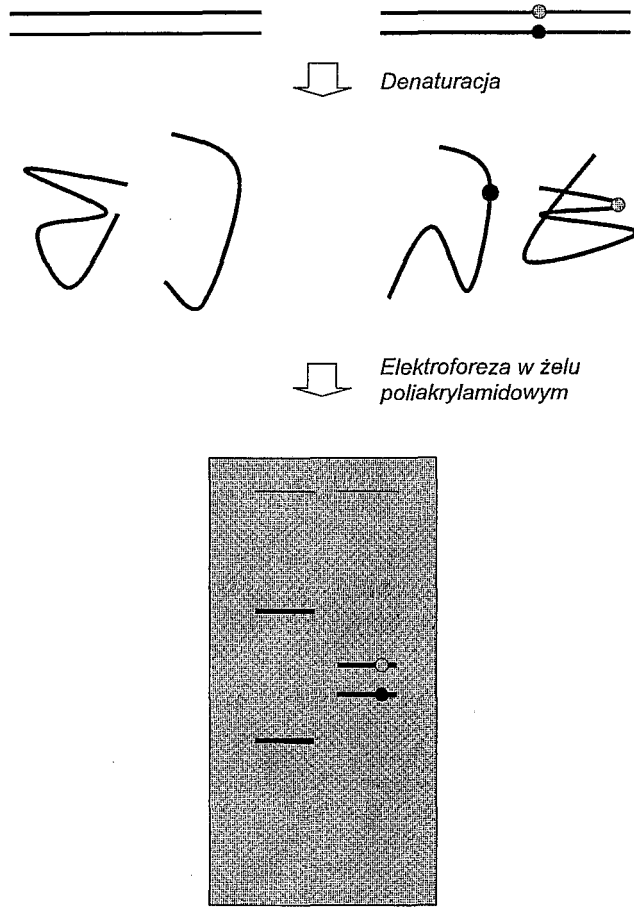


Rysunek 4. Schemat przebiegu reakcji PCR

i długości amplifikowanego odcinka DNA (dobierane są eksperymentalnie). Produkty PCR otrzymane w milionowych kopiach widoczne są podczas ich elektroforetycznego rozdzielu w żelu agarozowym w obecności barwiącego je bromku etydyny.

### Wykrywanie polimorfizmu konformacyjnego pojedynczych nici (SSCP)

Dwuniciowe fragmenty DNA podczas elektroforezy w żelach agarozowych i poliakrylamidowych poruszają się z szybkością zależną od ich długości a nie od składu



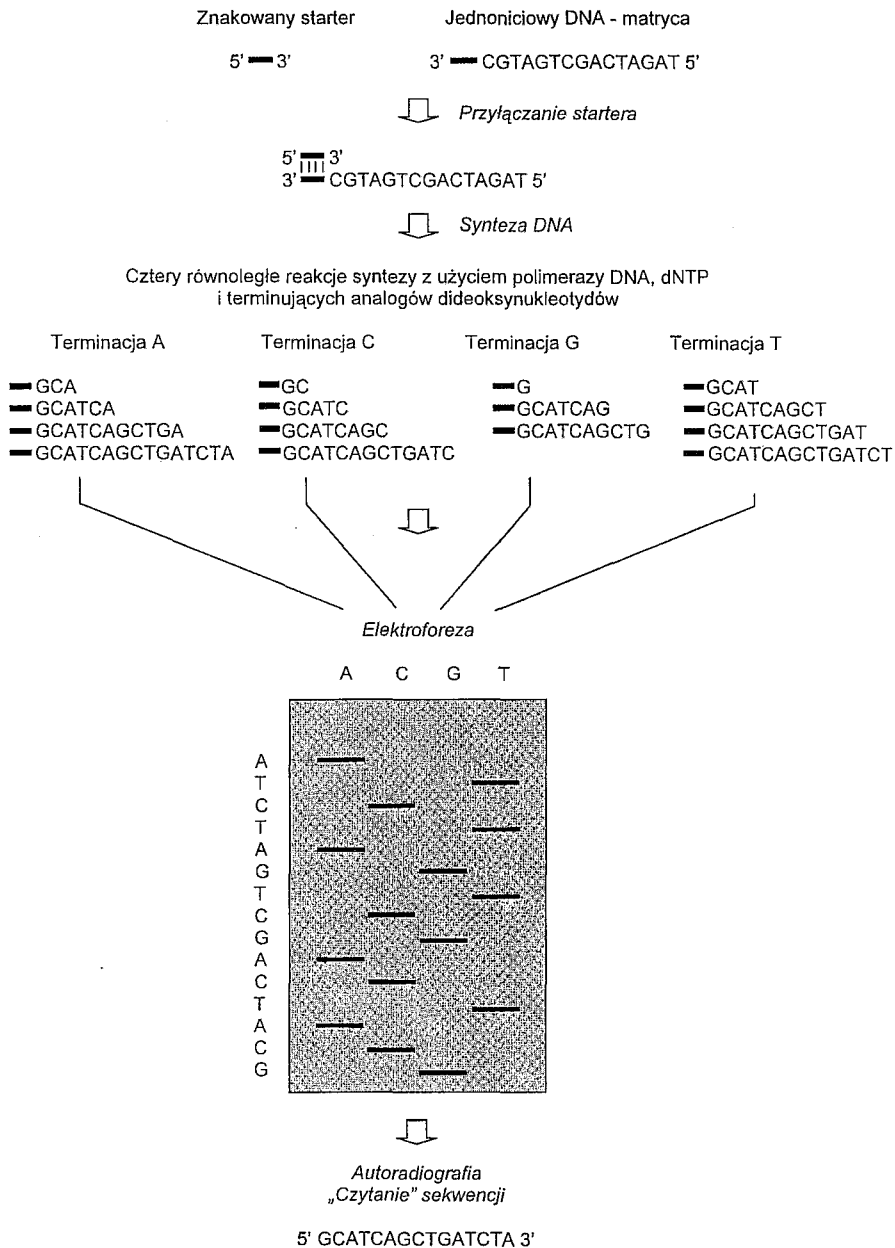
Ryunek 5. Schemat poszukiwania polimorfizmu konformacyjnego pojedynczych nici DNA – technika SSCP. Zdenaturowana mieszanina produktów PCR zawierających jednakowej wielkości odcinki DNA różniące się sekwencją nukleotydową (mutacja punktowa) poddawana jest elektroforezie w żelu poliakrylamidowym

nukleotydowego. Tym samym, odcinki DNA otrzymane w reakcji PCR z dwóch różnych kopii genu wydają się identyczne, mimo nieco odmiennej sekwencji. Rozłączone pojedyncze nici DNA (zdenaturowane) przybierając charakterystyczną dla siebie, zależną od sekwencji strukturę przestrzenną (konformacyjną), wykazują własną inną ruchliwość elektroforetyczną. Właściwość ta znalazła zastosowanie w technice wykrywania polimorfizmu konformacyjnego pojedynczych nici – SSCP (ang. *single strand conformation polymorphism*), polegającej na rozdziale w żelu

poliakrylamidowym zdenaturowanych (jednoniciowych) produktów PCR (rys. 5). Uwidaczniająca się inna szybkość migracji fragmentu DNA świadczy o zmienionej sekwencji badanego genu, będącej przejawem polimorfizmu lub mutacji.

### Sekwencjonowanie

Poznanie pełnej sekwencji nukleotydowej badanego odcinka DNA może dostarczyć informacji o naturze mutacji. Służy temu technika sekwencjonowania, czyli ustalania kolejności poszczególnych nukleotydów w obu



Rysunek 6. Schemat sekwencjonowania metodą Sangera

niciach badanego fragmentu DNA. Najczęściej stosowana jest metoda opracowana przez zespół Sangera polegająca na analizie produktów syntezy DNA *in vitro*, prowadzonej z użyciem badanego jednoniciowego

odcinka DNA zwanego matrycą (rys. 6). Wykonuje się równoległe cztery reakcje różniące się składem mieszaniny reakcyjnej. W każdej znajdują się ta sama matryca i odczynniki konieczne do syntezy drugiej



nici DNA (w tym radioaktywny starter), a dodatkowo dideoksyfosforan wybranego nukleotydu (ddATP, ddTTP, ddCTP lub ddGTP) powodujący zatrzymywanie syntezy nowej nici w pozycji jego wbudowania. Produkty każdej reakcji syntezy zawierają szereg różnej długości odcinków nowopowstałej nici, kończących się zawsze wbudowanym dideoksynukleotydem. Podczas równoległej elektroforezy produktów wszystkich czterech reakcji następuje ich rozdzielenie, a autoradiograficzna detekcja pozwala na ustalenie ich względnej wielkości, a tym samym poznanie sekwencji analizowanej nici. Wykonanie analogicznego badania z użyciem drugiej komplementarnej nici DNA jest kontrolą uzyskanych wyników. Porównanie sekwencji badanej z sekwencją prawidłową umożliwia wykrycie mutacji.

## WERYFIKACJA DIAGNOZY KLINICZNEJ

Wielokrotnie nietypowy obraz choroby stwarza trudności w ustaleniu właściwego rozpoznania klinicznego. Niekiedy objawy kilku jednostek chorobowych są bardzo podobne i uniemożliwiają jednoznaczne postawienie diagnozy. Dzieje się tak m.in. w przypadku dystrofii mięśniowej obręczowo-kończynowej (ang. *limb girdle muscular dystrophy* – LGMD) i dystrofii mięśniowej Beckera. Podobnie trudne jest różnicowanie poszczególnych ataksji rdzeniowo-mózdkowych (ang. *spinocerebellar ataxia* – SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6), a objawy form dziecięcych chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego znacznie odbiegają od objawów form dorosłych. Istnieje szereg metod fizykochemicznych wspierających diagnostykę kliniczną, jednak najlepszym narzędziem badawczym sięgającym do samego podłoża choroby jest analiza DNA. Rutynowa diagnostyka molekularna staje się możliwa dopiero po wykryciu samego genu, którego uszkodzenia wywołują chorobę<sup>2</sup>. Konieczne jest więc poznanie jego budowy (struktury eksonowej) oraz rodzaju

i częstości mutacji (mutacje punktowe, delecje, mutacje dynamiczne) pozwalających dobrać najlepszą i najtańszą metodę badawczą o wysokim odsetku wykrywania uszkodzeń genu. Dodatkową zaletą analizy DNA jest to, że może być ona stosowana w przypadkach, w których nieznan jest przebieg choroby na poziomie biochemicznym lub struktur subkomórkowych, a dostępne metody są wysoce inwazyjne.

Znając podłoże molekularne wielu chorób uwarunkowanych genetycznie opracowano najefektywniejsze strategie postępowania diagnostycznego. Delecje fragmentu genu dystrofiny położonego na chromosomie X będące przyczyną 60% przypadków dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera wykrywane są z zastosowaniem hybrydyzacji wg Southerna lub reakcji PCR (brak prążka hybrydyzacyjnego, brak produktów amplifikacji oznacza wykrycie delecji) [1]. Podobnie, homozygotyczne delecje genu SMN<sup>T</sup> położonego na chromosomie 5 wywołujące 95% przypadków rdzeniowego zaniku mięśni (ang. *spinal muscular atrophy*, SMA) wykrywane są z zastosowaniem reakcji PCR [6]. Najczęstsza mutacja punktowa (mutacja śródziemnomorska), będąca podłożem fawizmu, powoduje zmianę sekwencji i pojawienie się nowego miejsca restrykcyjnego w położonym na chromosomie X genie G6PD. Obecność zmienionej sekwencji stwierdza się poddając zamplifikowany fragment genu trawieniu enzymem *MboI* G6PD (przecięcie produktu reakcji PCR oznacza wykrycie mutacji) [5]. W diagnostyce molekularnej neurofibromatozy II (NFII) konieczne jest poszukiwanie licznych mutacji punktowych rozrzuconych w wielu miejscach genu. Lokalizuje się je stosując metodę SSCP (zmieniona ruchliwość elektroforetyczna jednoniciowego odcinka DNA może wskazywać na obecność mutacji punktowej), a następnie precyzyjnie określa ich charakter, sekwencjonując

<sup>2</sup> Przedstawienie takich badań nie jest jednak tematem niniejszego artykułu i zainteresowany czytelnik powinien sięgnąć do odpowiedniej literatury.

jedynie wybrany fragment genu [9]. Mutacja dynamiczna będąca przyczyną choroby Huntingtona (HD) powoduje zmianę długości początkowego odcinka genu IT15. Wykrywa się ją amplifikując ów fragment i poddając produkty reakcji PCR elektroforezie w żelu poliakrylamidowym [4].

Podane przykłady ilustrują sposób dobierania metod badawczych, których celem jest nie tylko rutynowe wykrywanie znanych mutacji, ale również poszukiwanie korelacji genotypowo-fenotypowych w badanych jednostkach chorobowych. Delecje wykrywane w genie dystrofiny u chorych dotkniętych dystrofią mięśniową Duchenne'a i Beckera zaburzając odczyt sekwencji białkowej za miejscem mutacji, wywołują ostrą postać choroby (typ Duchenne'a), pozostawiając zaś możliwość syntezy białka za miejscem uszkodzenia wywołują łagodną postać choroby (typ Beckera). Precyzyjne określenie granic delecji pozwala stwierdzić, czy narusza ona, czy zachowuje tzw. ramkę odczytu, a co za tym idzie, z wysokim prawdopodobieństwem przewidzieć dalszy przebieg choroby [7]. Mutacje dynamiczne mogą powodować zwiększenie liczby powtórzeń trójków nukleotydowych u potomstwa osoby chorej, a tym samym wywoływać wcześniejsze pojawienie się objawów i ostrzejszy przebieg schorzenia. Zjawisko narastania ostrości przebiegu choroby w jednej rodzinie nazwane antycypacją, uważane do niedawna za wynik subiektywnego doboru danych klinicznych i statystycznych, znalazło wytłumaczenie w swym molekularnym podłożu. Przykładem jego wystąpienia jest rodzinny przebieg dystrofii miotonicznej (MD) – zająca w pierwszym pokoleniu, klasyczna forma choroby (postępujące osłabienie i zanik mięśni) w drugim, a wrodzona dystrofia miotoniczna z głębokim upośledzeniem umysłowym i zanikiem mięśni w trzecim [2]. Podobnie paradoks Sherman mówiący, że wyższe jest ryzyko zachorowania wnuków niż rodzeństwa osoby chorej w rodzinach obciążonych zespołem kruchego chromosomu X, znalazł w wywołującej go mutacji

dynamicznej wytłumaczenie molekularnego podłoża tej najczęstszej formy dziedzicznego upośledzenia umysłowego [3].

## OKREŚLANIE NOSICIELSTWA I DIAGNOSTYKA PRENATALNA

W rodzinach dotkniętych chorobami uwarunkowanymi genetycznie niezwykle ważne staje się rozpoznanie osób będących nosicielami mutacji. W przypadku chorób rozpoczynających się w wieku dorosłym powodowanych mutacjami dominującymi analiza DNA wyprzedza wystąpienie objawów i na wyraźne życzenie zainteresowanych daje im informację o nadchodzącej chorobie. W przypadku chorób wywoływanych mutacjami recesywnymi analiza DNA daje nosicielom możliwość wyboru między ryzykiem urodzenia chorego dziecka, diagnozą prenatalną lub świadomą rezygnacją z posiadania potomstwa. Badania przeprowadzone na poziomie DNA umożliwiają również wykluczenie nosicielstwa mutacji, tym samym dostarczają osobom zainteresowanym komfortu psychicznego i częstokroć pozwalają podjąć decyzję o posiadaniu potomstwa.

Ustalenie nosicielstwa uszkodzonego genu dla mutacji dominującej polega na wykryciu jej u osoby zdrowej. Postępuje się tak w badaniu przedobjawowym w chorobie Huntingtona lub ataksjach rdzeniowo-mózdkowych. Określanie nosicielstwa mutacji recesywnej mukowiscydozy, najczęstszej choroby uwarunkowanej genetycznie, opiera się na założeniu, że zarówno ojciec jak i matka mają w swym genomie po jednej uszkodzonej kopii genu. W analizie DNA śledzi się dziedziczenie przez rodzeństwo uszkodzonych genów (tych, które wykryto u chorego dziecka). W badaniu tym wykorzystuje się sekwencje polimorficzne, które umożliwiają rozróżnienie u każdej osoby dwóch posiadanych alleli (kopii genu) i prześledzenie ich dziedziczenia. O badanych sekwencjach mówi się, że są sprzężone z mutacją, tzn. występują w jej pobliżu. Analizę przeprowadza się kilkupunktowo

dla 2–3 sekwencji polimorficznych położonych po obu stronach genu, aby wykluczyć możliwą rekombinację (skutek wymiany odcinków DNA podczas procesu *crossing-over*). Osoba, u której stwierdzi się obecność jednej sekwencji polimorficznej, spośród wykrytych u chorego/chorej, jest nosicielem mutacji.

Inny tryb postępowania musi być przyjęty w procesie ustalania nosicielstwa mutacji, której częstość powstawania *de novo* jest wysoka. Nie można wówczas założyć, że rodzice chorego dziecka są nosicielami uszkodzonego allelu, gdyż mutacja powodująca chorobę mogła mieć miejsce w trakcie procesu oogenezy (lub spermatogenezy). W dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera 1/3 matek jedyne chorego chłopca (przypadek izolowany) nie jest nosicielkami mutacji – choroba syna wywołana jest nowopowstałym uszkodzeniem genu. Ustalenie statusu nosicielstwa w rodzinie dotkniętej DMD/BMD polega na wykryciu mutacji w obrębie genu dystrofiny u zainteresowanych kobiet. Badanie takie jest możliwe jedynie u części rodzin, w których delecja w obrębie genu dystrofiny obejmuje sekwencje polimorficzne. Wykrycie, że córka nie dziedziczy sekwencji matczynej (dziedziczy tylko ojcowską, a matka wydaje się homozygotą) oznacza, że w rzeczywistości matka jest hemizygotą i przekazała córce delecję (obie są nosicielkami delecji obejmującej analizowany odcinek genu).

Wykluczenie nosicielstwa mutacji polega na wykryciu w DNA osoby badanej dwóch prawidłowych kopii genu. Jest to analiza bezpośrednia, kiedy sprawdzeniu poddaje się fragment genu, w którym u osoby chorej wykryto mutację (choroba Huntingtona) lub analiza pośrednia, kiedy nie badając miejsca samej mutacji stwierdza się dziedziczenie po rodzicach, a nawet dziadkach, prawidłowych alleli znajdujących u zdrowych krewnych (dystrofia mięśniowa Duchenne'a/Beckera).

Wykrycie nosicielstwa mutacji recesywnej nie zamyka drogi do posiadania zdrowego

potomstwa. Mimo, iż obecnie nie jest jeszcze możliwe leczenie tak ciężkich chorób jak DMD/BMD czy SMA, a terapia genuwa jest we wstępnej fazie rozwoju, możemy zainteresowanym rodzinom proponować diagnostykę prenatalną. We wczesnym okresie ciąży (10–11 tydzień) możliwe jest pobranie komórek płodowych budujących łożysko – komórek trofoblastu i po wyizolowaniu z nich DNA wykonanie analizy mającej na celu określenie, czy płód dotknięty będzie chorobą występującą w rodzinie. Badanie polega na poszukiwaniu mutacji wykrytej wcześniej u osoby chorej. Wynik badania w wypadku wykrycia mutacji graniczy z pewnością.

W krajach wysoko rozwiniętych działania mające na celu określanie nosicielstwa mutacji najczęstszych chorób uwarunkowanych genetycznie w połączeniu z diagnostyką prenatalną pozwoliły zmniejszyć częstość ich występowania. Świadczy to, jak niezwykle ważna jest popularyzacja wiedzy o dostępności takich badań, zarówno wśród klinicystów jak i krewnych osób chorych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Beggs A.H., Koenig M., Boyce F.M., Kunkel L.M.: Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum. Gent.* 1990, 86, 45–48.
2. Brook J.D., McCurrach M., Harley H.G.: Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992, 68, 799–808.
3. Fu Y.-H., Kuhl D.P., Pizzuti A., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Richards S., Verkerk A.J.M., Warren S.T., Oostra B.A., Caskey C.T.: Variation of the CGG repeat of the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991, 67, 1047–1058.
4. Huntington Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosome. *Cell* 1993, 72, 971–983.
5. Jabłońska-Skwiecińska E., Zimowski J.G., Kłopocka J., Bisko M., Hoffman-Zacharska D.,

- Zaremba J.: Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Poland – a study on the 563 and 1311 mutations of the G6PD gene. *Eur. J. Hum. Gen.* 1997, 5, 22–24.
6. Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Benichou B., Cruaud C., Millasseau P., Zeviani M. i wsp.: Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995, 80, 155–165.
  7. Monaco A.P., Bertelson C.J., Liechti-Gallati S., Moser H., Kunkel L.M.: An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1998, 2, 90–95.
  8. Richards R.I., Sutherland G.R.: Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. *Cell* 1992, 70, 709–712.
  9. Ruttledge M.H., Andermann A.A., Phelan C.M., Claudio J.O., Han F.Y., Chretien N., Rangaratnam S., MacCollin M., Short P., Parry D., Michels V., Riccardi V.M., Weksberg R., Kitamura K., Bradburn J.M., Hall B.D., Propping P., Rouleau G.A.: Type of mutation in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) frequently determines severity of disease. *Am. J. Hum. Genet.* 1996, 59, 331–342.

*Adres: Dr Janusz G. Zimowski, Zakład Genetyki IPiN,  
Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa, e-mail: jgzima@plearn.edu.pl*